

高产几丁质酶巴伦葛兹类芽孢杆菌的筛选和发酵条件优化

付星¹ 闫巧娟² 江正强¹ 杨鑫斌¹ 刘竹青³ 杨绍青^{1*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

(2. 中国农业大学 工学院 北京 100083)

(3. 中国农业大学 水利与土木工程学院 北京 100083)

摘要:【目的】鉴定一株来源于中国南海海水样能够分泌多种胞外几丁质酶的一类芽孢杆菌 CAU904, 并优化其产几丁质酶的发酵条件。【方法】采用形态学观察、16S rDNA 序列比对及生理生化实验鉴定; 通过碳源、氮源、温度、初始 pH、表面活性剂种类以及发酵时间的单因素优化实验获得最佳发酵条件。【结果】菌株 CAU904 被鉴定为巴伦葛兹类芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*), 其最优发酵产酶条件为: 0.5% 胶体几丁质, 0.2% 酵母浸提物, 0.1% 吐温-80, 培养基初始 pH 7.0, 45 °C 培养 72 h。在最优发酵条件下, 该菌株最大产酶水平达到 8.2 U/mL, 比优化前提高了 5.4 倍。几丁质酶的酶谱分析表明该菌株能够产生多达 11 种具有几丁质水解活性的同工酶, 其中主要酶谱带对应分子量分别为 54、47 和 38 kD。【结论】实验结果为巴伦葛兹类芽孢杆菌几丁质酶的分离纯化和酶的应用提供了基础。

关键词: 巴伦葛兹类芽孢杆菌, 几丁质酶, 鉴定, 发酵, 优化

Screening of a high-level chitinase producing strain, *Paenibacillus barengoltzii* and optimization of its fermentation conditions

FU Xing¹ YAN Qiao-Juan² JIANG Zheng-Qiang¹ YANG Xin-Bin¹
LIU Zhu-Qing³ YANG Shao-Qing^{1*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(3. College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To identify a chitinase producing marine bacterium CAU904 isolated from China Nan Hai and optimize the fermentation conditions for chitinase production. [Methods] Strain CAU904 was identified based on its morphological characters and 16S rDNA sequence. The fermentation conditions for chitinase production by strain CAU94 were optimized using the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31172239); 国家 863 计划项目(No. 2012AA021505)

*通讯作者: Tel: 86-10-62737689; 信箱: ysq@cau.edu.cn

收稿日期: 2014-08-14; 接受日期: 2014-09-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-09

one-factor-at-a-time method. **[Results]** The strain CAU904 was identified as *Paenibacillus barengoltzii*, and the optimal fermentation conditions were obtained as follows: 0.5% colloidal chitin, 0.2% yeast extract, 0.1% Tween 80 (medium pH 7.0) 45 °C for 72 h. Under the optimized fermentation conditions, the highest chitinase activity of 8.2 U/mL was achieved, which was 5.4 folds higher than that obtained before. The chitinase zymogram analysis showed that at least 11 chitinases were secreted into the fermentation broth, and three major bands had molecular masses of 54, 47 and 38 kD, respectively. **[Conclusion]** The results can be helpful for further study on the purification and application of the chitinases from *Paenibacillus barengoltzii*.

Keywords: *Paenibacillus barengoltzii*, Chitinase, Identification, Fermentation, Optimization

几丁质酶(EC 3.2.1.14)是一类重要的水解酶,能够催化几丁质水解产生 *N*-乙酰氨基葡萄糖单体或低分子量几丁寡糖^[1]。近年来,几丁质酶因在制备几丁寡糖、处理海洋废弃物以及农业生物防治等方面具有大的应用潜力而备受关注。几丁质酶广泛存在于细菌、链霉菌、真菌、植物、昆虫甚至脊椎动物中。微生物来源的几丁质酶具有生产速度快、产量高、性能稳定等优点,已成为几丁质酶研究的主要来源。迄今,已有许多不同微生物来源几丁质酶的报道,其中细菌几丁质酶的研究较为广泛和深入^[1-2]。目前已报道产几丁质酶的细菌主要有弧菌(*Vibrio*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、单胞菌(*Monocleosis*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)等^[1,3-4]。海洋环境中含有丰富的几丁质,如虾壳、蟹壳、贝壳等,这些物质如果不经过处理,会造成严重的环境污染,其中酶法水解是几丁质降解的一条重要途径^[5]。但目前的研究还存在几丁质酶产生菌发酵产酶水平低、产酶周期长等问题,限制了其工业化生产。海洋中的微生物是几丁质酶的重要来源,与其他环境来源的几丁质酶相比,多数海洋几丁质酶具有耐受更高盐度、pH 以及温度等能力^[6]。这些极端环境的耐受特性有助于其工业应用,因此从海洋环境中筛选产几丁质酶的微生物对几丁质降解具有重要意义。

类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)最初归类在芽孢杆菌属(*Bacillus*),直到 1993 年由 Ash 等^[7]应用 PCR 探针技术将原属于芽孢杆菌的 11 个种分出来,才建立了新属。类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)倾向产生膨胀的、椭圆形的芽孢。近年来,已有一些类芽孢杆菌属菌株产几丁质酶的报道。2007 年 Patel 等^[8]

通过 Plackett-Burman 设计优化发酵条件,将萨拜娜类芽孢杆菌(*Paenibacillus sabina*) JD2 产几丁质酶水平提高 2.74 倍,达到 1.38 U/mL。2008 年 Ahmadi 等^[9]从伊朗分离获得了嗜几丁类芽孢杆菌(*Paenibacillus chitinolyticus*),发酵 3 d 几丁质酶活力为 0.1 U/mL。2010 年 Singh^[10]分离出一株产几丁质酶类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) D1,通过统计优化产酶达到 1.55 U/mL。Belen 等^[11]通过氮源优化使帕布利类芽孢杆菌(*Paenibacillus pabuli*)菌株发酵活力提高到 0.2 U/mL。本实验室从中国南海水样中筛选得到一株能够产几丁质酶的海洋细菌,鉴定其为巴伦葛兹类芽孢杆菌。目前,国内外还未见巴伦葛兹类芽孢杆菌产几丁质酶的研究报道。本文系统研究了巴伦葛兹类芽孢杆菌的选育、产几丁质酶的发酵条件优化,旨在发掘新的产几丁质酶菌株,提高几丁质酶的酶活力,为将来几丁质酶的生产 and 应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

BT100-2J 恒流蠕动泵,保定兰格仪器厂; TU-1800PC 紫外可见分光光度计,北京普析通用有限公司;硅胶板 60F₂₅₄,德国 Merck 公司; DK-S24 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司; GL-20B 冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂。

海水样采集自中国南海;制备培养基所用的几丁质购自山东潍坊科海甲壳素有限公司;酶活力测定用几丁质购自美国 Sigma 公司;胰蛋白胨及酵母粉购自英国 Oxoid;乙二醇几丁质购自日本 Wako

公司; 荧光增白剂 28 (Fluorescent Brightener 28) 购自美国 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白质购于宝生物工程(大连)有限公司; 其他试剂若无特殊说明均为分析纯。

1.2 培养基组成

筛选培养基(g/L): 胶体几丁质 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; K_2HPO_4 0.3; KH_2PO_4 0.7; FeSO_4 0.1; 琼脂 15.0; pH 自然。

摇瓶发酵培养基(g/L): 粉末几丁质 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; K_2HPO_4 0.3; KH_2PO_4 0.7; FeSO_4 0.1; pH 自然。

种子培养基: 同摇瓶发酵培养基。

种子液制备: 将单菌落用接种环接入到装有 100 mL 发酵培养基的三角瓶(500 mL)中, 45 °C、200 r/min 培养过夜, 即为种子液。

1.3 菌株筛选及鉴定

将水样用无菌水稀释后, 涂布于筛选培养基平板上, 于 50 °C 培养箱中培养。挑选有明显透明圈的菌落, 划线分离纯化。将划线后长出的单菌落接入摇瓶发酵培养基中进行产酶复筛, 45 °C 恒温摇床 200 r/min 培养 3 d, 离心后取发酵上清液测定酶活力。将酶活力较高的菌株保存并鉴定。

1.4 分子生物学鉴定

按照分子生物学操作手册提取目标菌株的 DNA, 利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增结果委托华大基因进行测序, 测序结果在 NCBI 数据库上进行序列比对。根据比对结果, 利用 ClustalX 和 MEGA 软件构建菌株系统发育树。同时按照伯杰细菌鉴定手册^[12]及文献^[13]的方法, 对目标菌株做培养特征分析和生理生化鉴定。

1.5 酶活力及蛋白含量测定

参照杨绍青等^[14]的方法并稍有改动, 取 200 μL 胶体几丁质溶液(1%)于 1.5 mL 离心管中, 50 °C 水浴预热 10 min, 然后向离心管中加入 200 μL 适当稀释的酶液。50 °C 反应 30 min 后加入 600 μL DNS 试剂终止反应, 最后煮沸 10 min 显色。12 000 r/min

离心 5 min, 取上清液 540 nm 下测吸光度值。酶活力单位(U)定义为: 在上述反应条件下每分钟释放 1 μmol *N*-乙酰氨基葡萄糖所需要的酶量, 同时以 *N*-乙酰氨基葡萄糖制作标准曲线。

蛋白含量的测定参照 Lowry 等的方法^[15], 以牛血清蛋白制作标准曲线。

1.6 产几丁质酶培养条件的优化

试验采用单因素条件对巴伦葛兹类芽孢杆菌产几丁质酶的发酵条件进行优化, 包括碳源、氮源、发酵温度、培养基 pH 值、表面活性剂以及培养时间。分别选取 0.5% (质量体积比) 粉末几丁质、胶体几丁质、虾蟹壳粉、粉末壳聚糖、蔗糖、可溶性淀粉、CMC、葡萄糖为碳源, 考察不同碳源对发酵产酶的影响。最佳碳源确定后考察碳源添加量对产酶的影响。在碳源优化的基础上, 选取 0.2% (质量体积比) 蛋白胨、牛肉膏、酵母浸提物、硫酸铵、硝酸铵、尿素为氮源, 进一步考察氮源对产酶的影响。然后考察发酵温度(30–55 °C), 培养基初始 pH (4.0–9.0) 以及 0.1% (质量体积比) 表面活性剂种类对产酶的影响。最后在优化后的培养条件下发酵, 考察几丁质酶的产酶历程并确定最佳发酵时间。

1.7 SDS-PAGE 及酶谱分析

SDS-PAGE 电泳使用分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 4.5%。考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白带, 并利用 Gel-Pro Analyzer 软件分析蛋白分子量。

几丁质酶酶谱: 电泳分离胶中加入 100 mg/L 乙二醇几丁质, 将电泳结束后的分离胶用 100 mmol/L 的乙酸钠溶液(pH 5.0)配成的 10 mL/L Triton X-100 复性 24 h, 然后用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.9)配制的 100 mg/L 荧光增白剂 28 染色 5 min, 再用蒸馏水洗 1 h, 最后将分离胶放置在紫外灯下观察, 几丁质酶活性带显示为暗带, 而背景为蓝色荧光。

1.8 数据分析

数据分析试验数据采用 Excel 软件进行分析, 试验中各发酵条件的优化均做 3 次平行, 结果取 3

次结果的平均值。

2 结果与分析

2.1 高产几丁质酶菌株的筛选及鉴定

利用几丁质酶筛选培养基,从中国南海水样中发现多个产生明显透明圈的菌株。通过分离纯化并进行摇瓶复筛,发现编号 CAU904 的菌株产几丁质酶能力较强。初始酶活力达到 1.5 U/mL,且产酶稳定,以此菌为进一步实验的菌株。根据分子生物学手册的方法扩增其 16S rDNA,测序结果在 NCBI 数据库中进行比对。结果显示菌株 CAU904 与巴伦葛兹类芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*)的一致性达到 99%,且系统发育树显示该菌株属于类芽孢杆菌属,与巴伦葛兹类芽孢杆菌(NR_113988)同属一个分支(图 1)。

培养特征显示该菌为革兰氏阳性棒状细菌,周围有椭圆形的孢子产生,严格好氧。菌落扁平,光滑,圆形,呈淡黄或乳白色,周围未发现色素产生。其生理生化特征(表 1)与 Osman 等^[13]报道的巴伦葛兹类芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*)特征一致。综上表明菌株 CAU904 为巴伦葛兹类芽孢杆菌。

2.2 碳源对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的影响

分别采用粉末几丁质、胶体几丁质、虾蟹壳粉、粉末壳聚糖、蔗糖、可溶性淀粉、CMC、葡萄糖作为唯一碳源,进行菌株产几丁质酶发酵实验,结果见表 2。当以胶体几丁质为碳源时产酶最高,达到 2.8 U/mL,其次为粉末几丁质(1.5 U/mL)和虾蟹壳(1.3 U/mL)。而以葡萄糖、蔗糖、CMC 或可溶性淀粉作为碳源时,几丁质酶的产量较低(≤ 0.4 U/mL)。同时考察了胶体几丁质添加浓度(0.1%–2.0%)对产酶的影响,结果表明 0.5%为最佳(数据未显示)。

2.3 氮源对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的影响

在最佳碳源的基础上,添加不同氮源(添加量均为 0.2%的有效氮)以考察氮源对菌株产几丁质酶的影响,结果见表 3。不同氮源对菌株产几丁质酶活力区别较大,其中以酵母浸提物作为氮源时酶活力最高,达到 4.9 U/mL,其次为蛋白胨,同时结果还表明该菌株也能利用无机氮源产几丁质酶。

2.4 发酵温度对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的影响

不同温度下发酵培养巴伦葛兹类芽孢杆菌,其

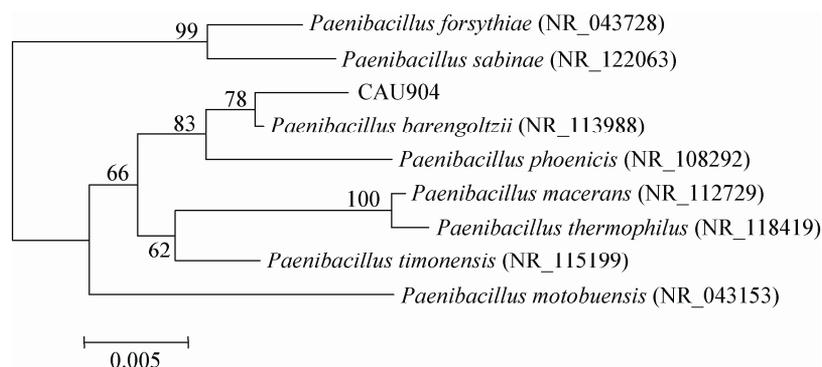


图 1 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 CAU904 系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain CAU904 based on 16S rDNA sequences

注:括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号;分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率;标尺刻度代表 0.5%的序列差异。

Note: Numbers in parentheses represent the sequence's accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.5% sequence divergence.

表1 菌株 CAU904 的形态及生理生化特征
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain CAU904

| 指标 Index | CAU904 |
|--|--------|
| 细胞形态 Morphology | 棒状 |
| 革兰氏染色 Gram-categorization | 阳性 |
| 产芽孢 Spore | - |
| 精氨酸双水解酶 Arginine double enzyme hydrolysis | - |
| 甘露糖 Mannose | - |
| 甘露醇 D-Vmannose | - |
| 麦芽糖 Maltose | + |
| 阿拉伯糖 Arabinose | - |
| 葡萄糖 Glucose | - |
| 蔗糖产酸 Sugar acids | - |
| 鼠李糖产酸 Rhamnose acid | - |
| 过氧化氢酶 Catalase | + |
| 麦芽糖 Maltose | + |
| 氧化酶 Oxidase | + |
| 硫化氢产生 H ₂ S | - |
| 吡啶产生 Benzpyrole | - |
| 色氨酸产生 Tryptophan | - |
| 硝酸盐还原 Nitrate reduction | + |
| 明胶液化 Gelatin liquefaction | - |

注: +: 阳性或能够利用; -: 阴性或不能利用.

Note: +: Positive or can be used; -: Negative or can not be used.

表2 不同碳源对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 发酵产几丁质酶的影响

Table 2 Effect of different carbon sources on chitinase production by *P. barengoltzii* CAU904

| 碳源 Carbon source | 酶活力 Enzyme activity (U/mL) |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 粉末几丁质 Chitin powder | 1.50±0.05 |
| 胶体几丁质 Colloidal chitin | 2.80±0.07 |
| 虾蟹壳粉 Shrimp and crab powder | 1.30±0.06 |
| 粉末壳聚糖 Chitosan powder | 0.90±0.05 |
| 蔗糖 Sucrose | 0.20±0.01 |
| 可溶性淀粉 Soluble starch | 0.10±0.01 |
| 羧甲基纤维素钠 CMC | 0.40±0.02 |
| 葡萄糖 Glucose | 0.20±0.01 |

注: 初始培养条件为 0.5% (质量体积比)粉末几丁质、0.2% (质量体积比)硫酸铵、pH 自然(6.0), 45 °C 发酵 3 d.

Note: Culture conditions: 0.5% (W/V) colloidal chitin, 0.2% (W/V) ammonium sulfate, natural pH (6.0), 45 °C for 3 days.

表3 不同氮源对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 发酵产几丁质酶的影响

Table 3 Effect of different nitrogen sources on chitinase production by *P. barengoltzii* CAU904

| 氮源 Nitrogen source | 酶活 Enzyme activity (U/mL) |
|-----------------------|------------------------------|
| 蛋白胨 Peptone | 3.50±0.12 |
| 牛肉膏 Beef extract | 2.70±0.11 |
| 酵母浸提物 Yeast extract | 4.90±0.16 |
| 硫酸铵 Ammonium sulfate | 2.80±0.07 |
| 硝酸铵 Ammonium nitrate | 1.90±0.07 |
| 尿素 Urea | 3.10±0.13 |

注: 初始培养条件为 0.5% (质量体积比)胶体几丁质、0.2% (质量体积比)硫酸铵、pH 自然(6.0), 45 °C 发酵 3 d.

Note: Culture conditions: 0.5% (W/V) colloidal chitin, 0.2% (W/V) ammonium sulfate, natural pH (6.0), 45 °C for 3 days.

产几丁质酶结果如图 2 所示。当发酵温度为 45 °C 时菌株产酶量最高, 达到 4.9 U/mL, 当培养温度降低到 35 °C 时, 酶活力明显下降, 为最高酶活力的一半左右, 当温度进一步降低到 30 °C 以下或升高到 55 °C 以上时, 产酶量出现了显著降低, 产酶量仅分别为最高酶活力的 40.8%和 8.1%。该菌株能在较高温度下高效生产几丁质酶, 有利于减少培养过程中的杂菌污染。

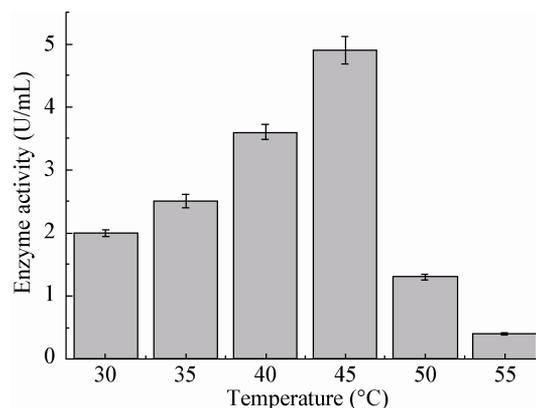


图2 不同温度对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 发酵产几丁质酶的影响

Figure 2 Effect of temperatures on chitinase production by *P. barengoltzii* CAU904

注: 初始培养条件为 0.5% (质量体积比)胶体几丁质、0.2% (质量体积比)酵母浸提物、pH 自然(6.0), 45 °C 发酵 3 d.

Note: Culture conditions: 0.5% (W/V) colloidal chitin, 0.2% (W/V) yeast extract, natural pH (6.0), 45 °C for 3 days.

2.5 培养基 pH 对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的影响

将液体发酵培养基调节至不同 pH 进行发酵,以考察初始 pH 对菌株产酶的影响。结果如图 3 所示,当初始 pH 为 7.0 时,菌株产酶量最高,达到 5.6 U/mL。培养基初始 pH 在 6.0–8.0 之间变动时, pH 对发酵产几丁质酶的影响不大,都保持在较高水平分别为最高值的 89.1%和 98.1%,而当初始 pH 继续升高时,酶活力降低明显,当 pH 升高至 9.0 时,巴伦葛兹类芽孢杆菌产酶量仅为最高值的 20%。

2.6 表面活性剂对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的影响

在初步优化培养基的基础之上,添加不同表面活性剂(0.1%)产几丁质酶实验,结果见表 4。添加吐温类表面活性剂对产酶有明显的促进作用,其中吐温-80 的作用最为明显,最高活力达到 8.2 U/mL,曲拉通 X-100 及司盘-80 对产酶也有一定的促进作用,而添加 SDS 则严重抑制几丁质酶的产生。

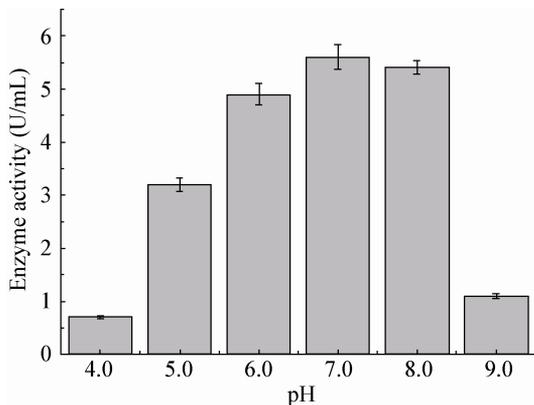


图3 培养基 pH 对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 发酵产几丁质酶的影响

Figure 3 Effect of initial medium pH on chitinase production by *P. barengoltzii* CAU904

注: 初始培养条件为 0.5% (质量体积比)胶体几丁质、0.2% (质量体积比)酵母浸提物、pH 自然(6.0), 45 °C 发酵 3 d.

Note: Culture conditions: 0.5% (W/V) colloidal chitin, 0.2% (W/V) yeast extract, natural pH (6.0), 45 °C for 3 days.

表 4 不同表面活性剂对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 发酵产几丁质酶的影响

Table 4 Effect of different surfactants on chitinase production by *P. barengoltzii* CAU904

| 表面活性剂 Surfactants | 酶活 Enzyme activity (U/mL) |
|------------------------|------------------------------|
| 空白 Control | 5.60±0.16 |
| 曲拉通 X-100 Triton X-100 | 7.60±0.26 |
| 吐温-20 Tween-20 | 6.90±0.24 |
| 吐温-80 Tween-80 | 8.20±0.34 |
| 十二烷基磺酸钠 SDS | 1.20±0.03 |
| 司盘-80 Emulsifier-80 | 5.90±0.16 |

注: 初始培养条件为 0.5% (质量体积比)胶体几丁质、0.2% (质量体积比)酵母浸提物、pH 7.0, 45 °C 发酵 3 d, 不添加任何表面活性剂。

Note: Culture conditions: 0.5% (W/V) colloidal chitin, 0.2% (W/V) yeast extract, pH 7.0, 45 °C for 3 days, containing no surfactants.

2.7 发酵时间对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的影响

在最佳参数的基础上,考察发酵时间对菌株发酵产酶的影响,结果如图 4 所示。菌株在优化后的发酵条件下,第 1 天即开始大量产酶,直至第 3 天时达到产酶高峰,此时酶活力达 8.2 U/mL。该菌株

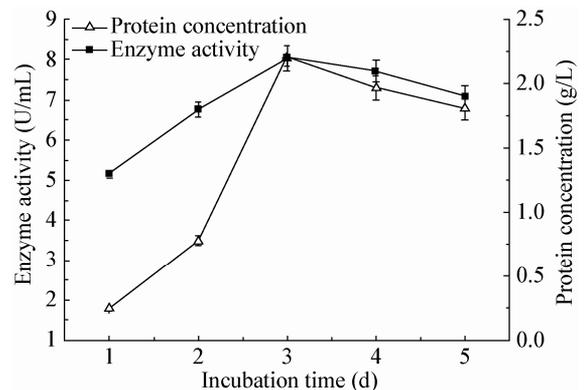


图 4 发酵时间对巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 发酵产几丁质酶的影响

Figure 4 Effect of fermentation time on chitinase production by *P. barengoltzii* CAU904

注: 初始培养条件为 0.5% (质量体积比)胶体几丁质、0.2% (质量体积比)酵母浸提物、0.1% (质量体积比)吐温-80, pH 7.0, 45 °C 发酵 3 d.

Note: Culture conditions: 0.5% (W/V) colloidal chitin, 0.2% (W/V) yeast extract, 0.1% (W/V) Tween-80, pH 7.0, 45 °C for 3 days.

在培养 4 d 后, 酶活力开始下降, 这与培养基中营养物质的消耗及代谢产物的积累有关。发酵过程中胞外蛋白质量浓度的变化趋势与酶活力的变化趋势相似。

2.8 巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 产几丁质酶的 SDS-PAGE 及酶谱分析

巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 在优化的培养基条件下发酵 3 d, 其粗酶液的 SDS-PAGE 及酶谱见图 5。该菌在以胶体几丁质为碳源诱导的情况下, 酶谱中出现 11 条具有几丁质水解活性的同工酶条带。其中有 3 条主带, 表明其活性较高, 对应蛋白的分子量分别为 54、47 和 38 kD。

3 讨论

类芽孢杆菌属是近来研究较热的细菌, 主要包括分泌生防拮抗物质、促进植物生长、产生多种胞外酶等^[16]。同时也是产几丁质酶的重要菌株之一,

因此受到研究者越来越多的关注^[17]。本实验室从采集自中国南海的海水样品中筛选得到一株高产几丁质酶的耐热细菌, 经鉴定为巴伦葛兹类芽孢杆菌。目前国内外还没有关于巴伦葛兹类芽孢杆菌产几丁质酶的报道。

通过单因素试验优化了巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 液体发酵产几丁酶的发酵条件。不同碳源对产酶的影响较大, 蔗糖、可溶性淀粉、CMC 和葡萄糖诱导产酶活力较低, 而胶体几丁质产酶效果最佳, 与 Andronopoulou 等的报道相似^[18]。Singh 报道类芽孢杆菌则以虾蟹壳作为最佳发酵碳源^[10]。胶体几丁质或粉末几丁质能作为单一碳源良好地诱导巴伦葛兹类芽孢杆菌产几丁酶, 说明几丁质类物质在菌株产几丁酶过程中扮演着诱导物的角色^[18]。氮源对产酶的影响也很显著, 有机氮源比无机氮源更有利于提高菌株的产酶活力, 其中酵母浸提物的效果最佳, 其次是蛋白胨。Meena 等^[19]也报道了酵母浸提物作为最佳氮源, 能够促进类芽孢杆菌发酵产几丁质酶。

发酵温度对产酶的影响实验表明, 巴伦葛兹类芽孢杆菌表现了较广的产酶温度范围(30–55 °C), 并且随着温度增加产酶活力逐渐提高。其最佳的培养温度为 45 °C, 温度在 50、55 °C 时仍具有一定的产酶能力。大部分细菌的最适产酶温度在 30–37 °C 之间。Kavitha 等^[20]报道唐德链霉菌(*Streptomyces tendae*)最适发酵温度为 37 °C。其他耐热细菌则具有更高的发酵温度。如 Kudan 等^[21]报道肠杆菌(*Enterobacter* sp.)的最适温度为 45 °C。Meena 等^[19]报道了一株耐热类芽孢杆菌, 其最适发酵温度为 45 °C。巴伦葛兹类芽孢杆菌的最适发酵温度较高, 表明其具有良好的耐热性。培养基的初始 pH 值对微生物的发酵同样也起着重要的作用, 大多数的细菌产几丁质酶的最适 pH 在中性或者略偏酸性^[22]。巴伦葛兹类芽孢杆菌的产酶最适 pH 为 7.0, 在 pH 5.0–8.0 之间时仍能保持较高的产酶能力。当培养基初始 pH 继续调整降低至 4.0 或升高至 9.0 时, 酶活力开始迅速下降。Singh 等^[10]报道的类芽孢杆菌 D1

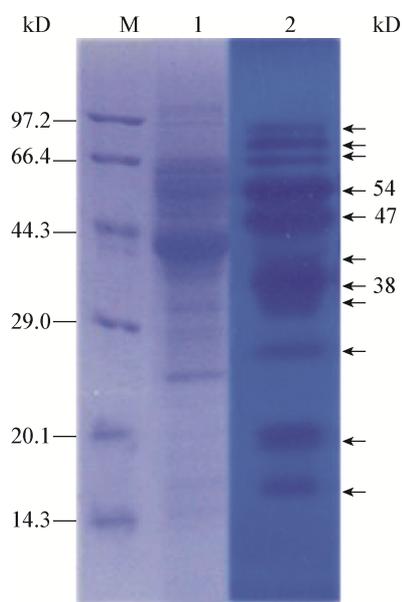


图 5 巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 的粗酶液电泳图及几丁质酶酶谱

Figure 5 SDS-PAGE and chitinase zymogram analysis of the crude proteins from *P. barengoltzii* CAU904

注: M: 低分子量标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: 几丁质酶酶谱。

Note: M: Low molecular weight marker; 1: Crude enzyme; 2: Zymogram.

最佳 pH 也为 7.0。在发酵时间对产酶历程的影响中,发现巴伦葛兹类芽孢杆菌在发酵第 1 天时即有几丁质酶活性,在第 3 天时达到产酶高峰,随后活性逐渐降低。与以前报道的帕布利类芽孢杆菌(4 d)^[11]及类芽孢杆菌 BISR-047 (6 d)^[19]相比,巴伦葛兹类芽孢杆菌的产酶效率更高,较短的发酵周期有利于生产操作及成本的控制。

目前国内类芽孢杆菌产几丁质酶的报道较少,国际上关于类芽孢杆菌属微生物产几丁质酶的水平大多数在 0.10–1.55 U/mL^[8-11]之间。最高的为 Meena 等^[19]分离的类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) BISR-047,经发酵优化几丁质酶活力在第 6 天时达到 11.86 U/mL,提高了 3 倍。而巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 的产酶水平经过优化后达到 8.2 U/mL,产酶水平仅次于 Meena 等的报道^[19]。关于嗜热微生物产几丁质酶的报道相对较少,杨绍青等^[14]筛选出一株高温紫链霉菌(*Streptomyces thermovolaceus*) Z16,通过优化产酶条件后,产酶水平达到 5.5 U/mL。本研究中巴伦葛兹类芽孢杆菌发酵条件经优化后的产酶量处于较高的水平。此外,比较特别的是该菌株能同时分泌多达 11 种胞外几丁质酶,这对于几丁质酶的多样性研究也具有潜在价值。许多微生物能够分泌不止一种几丁质酶(内切几丁质酶、外切几丁质酶、*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶)。如真菌哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)可以产生 7 种不同的几丁质酶,包括 2 个 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶(102 kD 和 73 kD),4 个内切几丁质酶(52、42、33 和 31 kD)和 1 个外切几丁质酶(40 kD);细菌中作为几丁质酶研究代表的粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)已报道产 5 种不同几丁质酶(21、36、48、52 和 57 kD);其他产几丁质酶较多的细菌,如环状芽孢杆菌(*B. circulans*)可产生 6 种几丁质酶,地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)可产生 5 种几丁质酶^[23]。当这些酶协同作用时,能够更高效地分解几丁质,产生微生物可以利用的几丁单糖或寡糖,为微生物提供营养^[24]。本研究为深入分析巴伦葛兹类芽孢杆菌的产几丁质酶特性,及其在未来工业化领域上的应用提供了基础。

参 考 文 献

- [1] Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: properties and potential[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(1): 21-28
- [2] Wang WX, Li FH. Research progress of microbial chitinase[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(32): 10196-10198 (in Chinese)
王伟霞,李福后. 微生物几丁质酶的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(32): 10196-10198
- [3] Yu CY, Han BQ, Li J, et al. The production condition and purification of chitinase from *Vibrio pacini*[J]. *High Technology Letters*, 2002, 9: 70-73 (in Chinese)
余长缨,韩宝芹,李静,等. 海洋弧菌几丁质酶的产酶条件及分离纯化研究[J]. *高技术通讯*, 2002, 9: 70-73
- [4] Feng JL, Zhu XF. Molecular biology study of microbial chitinase[J]. *Journal of Zhejiang University*, 2004, 30(1): 102-108 (in Chinese)
冯俊丽,朱旭芬. 微生物几丁质酶的分子生物学研究[J]. *浙江大学学报*, 2004, 30(1): 102-108
- [5] Zhang C, Huang DZ, Li FS, et al. Studies on the screening of chitinase producing strain from ocean and its optimization on fermentation[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2012, 34(2): 141-146 (in Chinese)
张灿,黄德智,李丰硕,等. 海洋产几丁质酶菌株的筛选及发酵条件优化[J]. *吉林农业大学学报*, 2012, 34(2): 141-146
- [6] Debashish G, Malay S, Barindra S, et al. Marine enzymes[J]. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 2005, 96: 189-218
- [7] Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, 64: 253-260
- [8] Patel B, Gohel V, Raol B. Statistical optimisation of medium components for chitinase production by *Paenibacillus sabina* strain JD2[J]. *Annals of Microbiology*, 2007, 57(4): 589-597
- [9] Ahmadi K, Yazdi MT, Najafi MF, et al. Isolation and characterization of a chitinolytic enzyme producing microorganism, *Paenibacillus chitinolyticus* JK2 from Iran[J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 3(6): 395-404
- [10] Singh AK. Optimization of culture conditions for thermostable chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(21): 2291-2298
- [11] Belen JJ, Belen RM, Victoria MT. Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of *Paenibacillus pabuli* isolated from crab shells samples collected in the east sector of central Tyrrhenian Sea[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 43(1): 27-31
- [12] Holt JG. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 190-255
- [13] Osman S, Satomi M, Venkateswaran K. *Paenibacillus pasadenensis* sp. nov. and *Paenibacillus barengoltzii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly facility[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1509-1514
- [14] Yang SQ, Zhang SP, Yan QJ, et al. Screening of high chitinase production strain, *Streptomyces thermoviolaceus* and optimization of fermentation condition[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2013, 18(2): 167-173 (in Chinese)
杨绍青,张舒平,闫巧娟,等. 高产几丁质酶高温紫链霉菌的筛选和发酵条件优化[J]. *中国农业大学学报*, 2013, 18(2): 167-173
- [15] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*,

